

## MONITORAGGIO E DIAGNOSI MEDIANTE METODI CLASSICI E MOLECOLARI DI FUNGHI TRASMESSI PER SEMI IN ZUCCA (*CUCURBITA MAXIMA*, *CUCURBITA MOSCHATA*)

M. MOUMNI<sup>1,2,3</sup>, M. BECHIR ALLAGUI<sup>3</sup>, V. MANCINI<sup>1</sup>, S. MUROLO<sup>1</sup>,  
G. ROMANAZZI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona

<sup>2</sup> National Agricultural Institute of Tunisia, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 Tunis, Tunisia

<sup>3</sup> Laboratory of Plant Protection, National Institute for Agronomic Research of Tunisia, University of Carthage, Rue Hédi Karray, 2080 Ariana, Tunisia  
g.romanazzi@univpm.it

### RIASSUNTO

Nel bacino del Mediterraneo, la zucca è una delle colture più importanti e può essere soggetta a diversi agenti patogeni fungini trasmessi per seme. Tra il 2015 e il 2018, 66 campioni di semi estratti da frutti di zucca asintomatici e sintomatici (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*), sono stati raccolti in Italia e Tunisia. Usando il blotter test, l'isolamento in piastra e la successiva osservazione al microscopio, i funghi più frequentemente rinvenuti sui campioni italiani sono stati *Alternaria alternata* (23,6%), *Fusarium fujikuroi* (12,7%), *Curvularia spicifera* (2,1%) e *Rhizopus stolonifer* (1,8%). Nei campioni tunisini sono stati trovati prevalentemente *A. alternata* (11,3%), *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (5,5%), *F. fujikuroi* (5,2%), *Fusarium solani* (5,2%), *R. stolonifer* (5,0%), *S. vesicarium* (1,1%) e *Albifimbria verrucaria* (0,6%). L'identificazione morfologica è stata confermata dalla identificazione molecolare utilizzando primer specifici. Il livello di contaminazione dei semi di zucca è risultato elevato in entrambi i Paesi e la disponibilità di protocolli per il controllo dello stato sanitario delle sementi si conferma condizione imprescindibile per l'ottenimento di produzioni di qualità.

**Parole chiave:** blotter test, diagnosi molecolare, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*

### SUMMARY

#### MONITORING AND DIAGNOSIS OF SEEDBORNE FUNGI IN SQUASH (*CUCURBITA MAXIMA*, *CUCURBITA MOSCHATA*) BY CLASSIAL AND MOLECULAR TOOLS

In the Mediterranean basin, squash is one of the most important crops, and it can be affected by several seedborne fungal pathogens. Between 2015 and 2018, 66 samples of asymptomatic and symptomatic squash fruits (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*) were collected in Italy and Tunisia. Following the blotter test, the *in vitro* isolation and the observation by microscope, the fungi frequently recorded in Italy were *Alternaria alternata* (23,6%), followed by *Fusarium fujikuroi* (12,7%), *Curvularia spicifera* (2,1%), and *Rhizopus stolonifer* (1,8%). In Tunisian samples, *A. alternata* (11,3%), followed by *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (5,5%), *F. fujikuroi* (5,2%), *Fusarium solani* (5,2%), *R. stolonifer* (5,0%), *S. vesicarium* (1,1%), and *Albifimbria verrucaria* (0,6%) were found. Morphological identification was confirmed by molecular identification using specific primers. Contamination level was relatively high in both Countries, and the setting up of protocols for testing the presence of seedborne fungi is basilar to get high quality productions.

**Keywords:** blotter test, molecular diagnosis, squash, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*

## INTRODUZIONE

Alle Cucurbitacee appartengono le principali specie ortive coltivate, che sono componenti essenziali della dieta mediterranea, rappresentando una importante fonte di reddito per i Paesi del bacino del Mediterraneo. La zucca (*Cucurbita maxima* Duchesne, *Cucurbita moschata* Duchesne) è una delle colture più importanti in Italia e Tunisia, con una produzione totale rispettivamente di 580.188 e 90.080 tonnellate (FAO, 2016). La zucca può essere soggetta a diverse malattie, tra cui il cancro gommoso o marciume nero dei frutti (causato da *Stagonosporopsis cucurbitacearum*), il marciume dei frutti (causato da *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*) e l'alternariosi (causata da *Alternaria alternata* ed *Alternaria cucumerina*) (Moumni et al., 2020). Tutte queste malattie possono essere determinate da patogeni presenti all'esterno o all'interno dei semi (Mancini e Romanazzi, 2014), che rappresentano un efficiente veicolo di disseminazione a breve e lunga distanza (Mancini et al., 2016). Circa il 90% delle colture alimentari del mondo sono riprodotte per seme, pertanto, l'uso di sementi certificate il cui stato sanitario è stato valutato, è raccomandato per evitare importanti perdite economiche.

Tra i metodi convenzionali, quello che viene comunemente utilizzato per verificare lo stato fitosanitario delle sementi è il *blotter test*, che consiste nell'incubare i semi su carta sterile, in capsule Petri. Le condizioni di umidità e temperatura utilizzate promuovono la crescita del micelio e la formazione di corpi fruttiferi, la cui osservazione al microscopio consente l'identificazione dei patogeni. Il problema principale legato alla presenza di microrganismi saprofiti sulla superficie del seme può essere facilmente aggirato attraverso la decontaminazione superficiale (Mancini e Romanazzi, 2014). Tuttavia, alcune specie fungine presentano un alto grado di somiglianza in base alla loro morfologia, pertanto, particolarmente utile ai fini diagnostici risulta l'applicazione di tecniche molecolari (Mancini et al., 2016).

Gli obiettivi principali del presente studio sono stati: (i) stimare l'incidenza di funghi trasmessi mediante il seme su campioni sintomatici e asintomatici; (ii) identificare le principali specie fungine sulla base delle caratteristiche morfologiche, (iii) identificare *S. cucurbitacearum*, *A. alternata*, *Curvularia spicifera*, *F. solani* e *Fusarium oxysporum*, *Paramyrothecium roridum*, *Albifimbria verrucaria* e *Stemphylium vesicarium* utilizzando tecniche molecolari.

## MATERIALI E METODI

### Raccolta dei campioni

Tra il 2015 e il 2018, sono stati raccolti in Italia e Tunisia 66 campioni di zucca asintomatici e sintomatici delle varietà più comunemente coltivate. In Italia, tra settembre e ottobre 2018 sono stati raccolti 29 campioni appartenenti alle varietà Aspen, Butternut e Naples Long presso campi commerciali nei comuni di Osimo (AN), Recanati (MC), Baranello (CB) e Monopoli (BA). Inoltre, 37 campioni sono stati raccolti in Tunisia dalle varietà Batati, Bjaoui e Galaoui tra luglio 2015 e novembre 2016 da diverse aziende agricole nelle cinque principali regioni di produzione (Sidi Hamada, Kalâat El-Andalous, Utique, Sbeitla e Sahline). Dai frutti portati in laboratorio sono stati estratti i semi, successivamente utilizzati per ulteriori analisi.

### Valutazione dei sintomi e determinazione dei funghi associati ai frutti

Per ciascun frutto raccolto è stata fatta una valutazione dei sintomi, attribuendo tre livelli di gravità: A = frutto asintomatico; B = frutto con necrosi superficiale che non raggiunge la cavità del frutto; C = frutto con necrosi profonda che raggiunge la cavità del frutto. Dai frutti raccolti è stato prelevato un frammento di tessuto, che è stato sterilizzato in una soluzione di ipoclorito all'1% per 5 min, lavato in acqua sterile, successivamente lasciato asciugare sotto

cappa a flusso laminare, posto in piastre Petri contenenti PDA ed incubato a  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  per 14 giorni.

### **Determinazione dei funghi associati al seme mediante strumenti classici**

I semi sono stati separati, lavati e asciugati su fogli di carta assorbente sterili. Ogni campione comprendeva semi raccolti da un singolo frutto. Duecento semi per campione sono stati testati utilizzando il metodo *blotter*, previsto dalle norme internazionali ISTA (Mathur e Kongsdal 2003). L'identificazione dei funghi è stata effettuata inizialmente effettuando osservazioni allo stereomicroscopio dei corpi fruttiferi e del micelio sviluppatosi sui semi. Successivamente, sono state asportate le strutture riproduttive dei funghi per un'ulteriore osservazione al microscopio ottico. Infine, i propaguli dei funghi sono stati inseminati in piastre Petri contenenti PDA, in modo da poter avere un'ulteriore conferma dell'identificazione, basandosi anche su caratteri morfologici della colonia (forma, colore).

### **Identificazione molecolare di funghi associati al seme**

Sulla base dell'identificazione morfologica, 93 isolati rappresentativi di 14 specie isolate sono stati utilizzati per stabilire un protocollo di rilevazione basato su strumenti molecolari. Gli isolati sono stati coltivati in piastre Petri di PDA fino a quando i funghi non hanno raggiunto il bordo della piastra. Il DNA è stato estratto secondo Varanda et al. (2016). Sono stati utilizzati primer specifici per *S. cucurbitacearum*, *A. alternata*, *C. spicifera*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. verrucaria*, *P. roridum* e *S. vesicarium* (Moumni et al., 2020).

## **RISULTATI**

### **Valutazione dei sintomi e determinazione dei funghi associati ai frutti**

Dai 29 campioni raccolti in Italia, 15 frutti hanno mostrato necrosi superficiale (classe B), 5 frutti necrosi profonda (classe C) ed i restanti sono risultati asintomatici (classe A). Dai 37 campioni raccolti in Tunisia, 9 frutti hanno mostrato necrosi superficiale (classe B), 2 frutti mostravano necrosi profonda (classe C), mentre i restanti campioni raccolti risultavano asintomatici (classe A). Dai campioni raccolti è stato possibile isolare prevalentemente *F. solani*, *C. spicifera*, *A. alternata* e *S. cucurbitacearum*.

### **Frequenza di funghi patogeni trasmissibili mediante il seme**

Dall'analisi classica micologica effettuata sui campioni di semi è stato possibile isolare un numero elevato di funghi (tabella 1). Nei campioni di semi provenienti dall'Italia, *A. alternata* è stato il fungo più frequentemente isolato (40,0%) nel sito di Recanati, seguito da *F. fujikuroi* (20,8%), *C. spicifera* (7,3%) nel sito di Castelfidardo e *S. vesicarium* (3,0%) a Baranello. *A. alternata* è stato rilevato in tutte le località monitorate. Questo patogeno è stato isolato da semi estratti da frutti sintomatici con tasso di infezione dall'1% al 70%. Inoltre, *A. alternata* è stato identificato in otto frutti asintomatici, con tassi di infezione dall'1% al 37%.

*S. vesicarium* è stato rilevato in 12 dei campioni di semi raccolti, con tassi di incidenza dall'1% al 9%. I semi ottenuti da tre frutti sintomatici con livello di infezione "C" sono risultati infetti da *C. spicifera* con tassi di infezione dall'11% all'85%.

I funghi isolati da campioni di seme raccolti in Tunisia sono stati *A. alternata* (25,1%), *R. stolonifer* (13,3%), e *S. vesicarium* (2,3%) nel sito di Kalâat El-Andalous, *S. cucurbitacearum* (24,6%), *F. fujikuroi* (7,8%) e *A. verrucaria* (3,3%) a Sidi Hmada, e *F. solani* (16,6%) a Sbeitla. La presenza di *A. alternata* è stata rilevata in tutte le località esaminate, e nella maggior parte dei frutti sintomatici con un livello di infezione dal 6 al 50%. *S. cucurbitacearum* è stato rilevato in tre località della Tunisia (Sidi Hmada, Sbeitla, Utique).

Inoltre, *S. cucurbitacearum* è stato identificato anche nei semi di 12 frutti asintomatici, raccolti da queste tre località, con tassi di infezione dall'1% al 44%. *F. solani* è stato rilevato in 17 campioni di semi raccolti da tutte e cinque le località della Tunisia (46% dei campioni). *F. solani* è stato isolato da un frutto sintomatico, con un tasso di infezione del 7%. Inoltre, *F. solani* è stato isolato e identificato in 13 frutti asintomatici, con tassi di infezione dall'1% al 60%. *A. verrucaria* e *P. roridum* sono stati isolati da quattro campioni di semi ottenuti da frutti asintomatici raccolti nell'area di Sidi Hmada. *S. vesicarium* è stato isolato da 18 campioni di semi, con tassi di infezione dall'1% al 13%. *C. spicifera* è stata isolata da 12 campioni di semi raccolti da tutte e cinque le località, con tassi di incidenza dall'1% al 7%.

### **Identificazione molecolare di funghi patogeni trasmissibili mediante il seme**

Per alcuni dei patogeni fungini trasmessi per seme identificati in base alle caratteristiche morfologiche, quali *A. verrucaria*, *P. roridum*, *S. cucurbitacearum*, *A. alternata*, *C. spicifera*, *F. solani* e *F. oxysporum*, è stata effettuata anche una identificazione molecolare. I patogeni sono stati messi in coltura su PDA e, quando le colonie fungine hanno raggiunto il bordo della piastra, è stata svolta l'estrazione del DNA utilizzando primer specifici per ciascuno di essi. Ciò ha permesso di confermare l'identificazione delle colonie isolate sulla base delle caratteristiche morfologiche.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

In questo studio, è emerso che i due patogeni costantemente isolati da frutti sintomatici sia in Tunisia sia in Italia sono *A. alternata* e *S. cucurbitacearum*. *A. alternata* è un agente patogeno delle cucurbitacee, che può causare gravi perdite di produzione (Vakalounakis, 1990). Anche *S. cucurbitacearum* ha una distribuzione mondiale e può infettare almeno 12 generi e 23 specie di cucurbitaceae (Stewart et al., 2015; Rennberger e Keinath, 2018). *S. cucurbitacearum* è stata riportata in Italia nel 1885 su melone (Corlett, 1981), in Tunisia nel 2007 su anguria (Boughalleb et al., 2007) e su zucca in Italia nel 2019 (Moumni et al., 2019). I funghi patogeni *A. alternata*, *S. cucurbitacearum* e *C. spicifera* sono stati registrati con elevate percentuali su semi ottenuti da frutti sintomatici. Anche da frutti asintomatici sono stati isolati funghi (*Stagonosporopsis* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp.) trasmissibili per seme, in accordo con i risultati di precedenti lavori (El-Meleigi 1991; Keinath 2011; Petkar e Ji, 2017).

L'indagine ha confermato che non sono sufficienti attente ispezioni visive dei lotti di semi alla ricerca di possibili alterazioni di natura parassitaria, in quanto i semi non sintomatici potrebbero comunque risultare infetti e, di conseguenza, propagare patogeni trasmissibili per seme in campo. Semi estratti da frutti asintomatici possono inoltre contribuire alla diffusione su larga scala di questi agenti patogeni, nonché alla loro introduzione in nuovi areali di produzione. Pertanto, la corretta e precoce identificazione dei patogeni fungini è un fattore chiave per la protezione delle colture e per lo sviluppo di strategie efficaci di protezione (Mancini et al., 2016; Moumni et al., 2020). La diagnosi molecolare ha permesso di confermare l'identificazione basata sulle caratteristiche morfologiche dei funghi fitopatogeni che richiede personale altamente specializzato e, talvolta, la necessità di attendere la comparsa dei corpi fruttiferi, oltre a lasciare comunque dei margini di incertezza.

Nel complesso, l'applicazione di tecniche di diagnosi molecolari sempre più sensibili può permettere di selezionare semi esenti da contaminazioni di agenti patogeni, presupposto importante per l'ottenimento di produzioni di elevata qualità.

Tabella 1. Incidenza dei funghi associati al seme di zucca, raccolti in Tunisia e Italia

| Funghi                                  | Frequenza dei funghi isolati (%) <sup>a</sup> |          |          |          |          |       |                     |          |          |          |          |       |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------|---------------------|----------|----------|----------|----------|-------|
|                                         | Tunisia <sup>b</sup>                          |          |          |          |          |       | Italia <sup>b</sup> |          |          |          |          |       |
|                                         | SH                                            | KA       | Sb       | Ut       | Sa       | Media | Ca                  | Os       | Re       | Mo       | Ba       | Media |
| <i>Alternaria alternata</i>             | 11,3±1,3                                      | 25,1±1,8 | 10,5±1,8 | 6,8±1,0  | 3,0±0,5  | 11,34 | 4,2±0,7             | 13,0±1,2 | 40,0±2,6 | 25,0±2,7 | 36,0±4,0 | 23,64 |
| <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> | 24,6±2,3                                      | 0        | 2,5±0,6  | 0,6±0,2  | 0        | 5,54  | 0                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0     |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>              | 4,1±1,0                                       | 13,3±1,5 | 0,9±0,3  | 3,3±0,8  | 3,7±0,8  | 5,06  | 6,6±1,2             | 1,3±0,5  | 0        | 1,3±1,3  | 0        | 1,84  |
| <i>Fusarium fujikuroi</i>               | 7,8±1,2                                       | 6,5±1,0  | 2,0±0,6  | 6,3±1,0  | 3,7±1,2  | 5,26  | 20,8±1,8            | 7,1±0,8  | 20,0±2,0 | 8,0±2,1  | 8,0±1,3  | 12,78 |
| <i>Fusarium solani</i>                  | 6,9±1,2                                       | 0,6±0,2  | 16,6±2,7 | 1,9±0,6  | 0,1±0,1  | 5,22  | 0                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0     |
| <i>Albifimbria verrucaria</i>           | 3,3±0,8                                       | 0        | 0        | 0        | 0        | 0,66  | 0                   | 0,2±0,1  | 0        | 0,8±0,5  | 0        | 0,2   |
| <i>Stemphylium vesicarium</i>           | 1,6±0,6                                       | 2,3±0,7  | 1,0±0,4  | 0,3±0,1  | 0,4±0,1  | 1,12  | 0,1±0,1             | 0,4±0,1  | 2,0±0,5  | 0,5±0,5  | 3,0±1,2  | 1,2   |
| <i>Paramyrothecium roridum</i>          | 1,2±0,4                                       | 0        | 0        | 0        | 0        | 0,24  | 0                   | 0        | 0,7±0,3  | 0        | 1,5±1,0  | 0,44  |
| <i>Phoma</i> sp.                        | 1,1±0,4                                       | 0        | 0        | 0        | 0        | 0,22  | 0                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0     |
| <i>Aspergillus brasiliensis</i>         | 0,8±0,4                                       | 1,0±0,2  | 0,6±0,6  | 0,1±0,1  | 0,1±0,1  | 0,52  | 0                   | 1,0±0,3  | 0        | 2,0±0,9  | 0        | 0,6   |
| <i>Fusarium oxysporum</i>               | 0,9±0,3                                       | 0,3±0,1  | 0,4±0,3  | 0,2±0,1  | 0        | 0,36  | 0                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0     |
| <i>Curvularia spicifera</i>             | 0,7±0,3                                       | 0,5±0,2  | 1,3±0,5  | 0,3±0,1  | 0,2±0,1  | 0,6   | 7,6±2,0             | 0,1±0,1  | 2,1±0,5  | 0,0      | 1,0±0,6  | 2,16  |
| <i>Alternaria solani</i>                | 0,8±0,4                                       | 0        | 0        | 0        | 0        | 0,16  | 0                   | 0        | 0        | 0        | 0        | 0     |
| <i>Fusarium incarnatum</i>              | 0,5±0,2                                       | 0,2±0,1  | 0,2±0,1  | 0,5±0,2  | 0,1±0,1  | 0,3   | 0                   | 0,5±0,1  | 0,1±0,1  | 0        | 0        | 0,12  |
| Totale semi infetti <sup>c</sup>        | 55,6±2,2                                      | 45,3±2,2 | 36,6±2,7 | 20,2±1,7 | 11,6±1,5 | 33,86 | 37,6±2,4            | 23,0±1,3 | 52,0±2,4 | 29,7±2,7 | 47,5±3,2 | 37,96 |

<sup>a</sup> Valori ± errore standard

<sup>b</sup> SH, Sidi Hmada; KA, Kalāat El-Andalous; Sb, Sbeitla; Ut, Utique; Sa, Sahline; Ca, Castelfidardo; Os, Osimo; Re, Recanati; Mo, Monopoli; Ba, Baranello

<sup>c</sup> lo stesso seme è risultato infetto da uno o più patogeni

## LAVORI CITATI

- Boughalleb N., El Mahjoub M., Abad-Campos P., Pérez-Sierra A., García-Jiménez J., Armengol J., 2007. First report of gummy stem blight caused by *Didymella bryoniae* on grafted watermelon in Tunisia. *Plant Disease*, 91, 468.
- Corlett M., 1981. A taxonomic survey of some species of *Didymella* and *Didymella*-like species. *Canadian Journal of Botany*, 59, 2016–2042.
- El-Meleigi M.A., 1991. *Alternaria* blossom-end rot and seedling blight of cucurbits in Al-Quassim. *Journal of King Saud University*, 3, 77-86.
- FAO, 2016. FAOSTAT data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Keinath A.P., 2011. From native plants in central Europe to cultivated crops worldwide: the emergence of *Didymella bryoniae* as a cucurbit pathogen. *HortScience*, 46, 532-535.
- Mancini V., Romanazzi G., 2014. Seed treatments to control seed-borne fungal pathogens of vegetable crops. *Pest Management Science*, 70, 860-868.
- Mancini V., Murolo S., Romanazzi G., 2016. Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. *Plant Pathology*, 65, 691-703.
- Mathur S.B., Kongsdal O., 2003. In: Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- Moumni M., Mancini V., Allagui M.B., Murolo S., Romanazzi G., 2019. Black rot of squash (*Cucurbita moschata*) caused by *Stagonosporopsis cucurbitacearum* reported in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 58, 379-383.
- Moumni M., Allagui M.B., Mancini V., Murolo S., Tarchoun N., Romanazzi G., 2020. Morphological and molecular identification of seedborne fungi in squash (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*). *Plant Disease*, 104 (in stampa).
- Petkar A., Ji P., 2017. Infection courts in watermelon plants leading to seed infestation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Phytopathology*, 107, 828-833.
- Rennberger G., Keinath A.P., 2018. Susceptibility of 14 new cucurbit species to gummy stem blight caused by *Stagonosporopsis citrulli* under field conditions. *Plant Disease*, 102, 1365-1375.
- Stewart J. E., Turner A.N., Brewer M.T., 2015. Evolutionary history and variation in host range of three *Stagonosporopsis* species causing gummy stem blight of cucurbits. *Fungal Biology*, 119, 370-382.
- Vakalounakis, D.J., 1990. *Alternaria alternata* f. sp. *cucurbitae*, the cause of a new leaf spot disease of melon (*Cucumis melo*). *Annals of Applied Biology*, 117, 507-513.
- Varanda C.M.R., Oliveira M., Materatski P., Landum M., Clara M.I.E., Félix M.D.R., 2016. Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biology*, 12, 1525-1536.